



Patent
Attorney's Docket No. 016800-111

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Patent Application of)
Yann MAHE et al) Group Art Unit: Unassigned
Application No.: Unassigned) Examiner: Unassigned
Filed: September 19, 1996)
For: PHARMACEUTICAL/COSMETIC)
COMPOSITIONS COMPRISING THE)
LYSINE-D-PROLINE-VALINE)
TRIPEPTIDE)

CLAIM FOR CONVENTION PRIORITY

Assistant Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

Sir:

The benefit of the filing date of the following prior foreign application in the following foreign country is hereby requested, and the right of priority provided in 35 U.S.C. § 119 is hereby claimed:

French Patent Application No. 95-10977

Filed: September 19, 1995.

In support of this claim, enclosed is a certified copy of said prior foreign application. Said prior foreign application was referred to in the original oath or declaration. Acknowledgement of receipt of this certified copy is requested.

Respectfully submitted,

BURNS, DOANE, SWECKER & MATHIS, L.L.P.

Date: September 19, 1996

By: 

Norman H. Steeno
Registration No. 22,716

P.O. Box 1404
Alexandria, Virginia 22313-1404
(703) 836-6620

THIS PAGE BLANK (USPTO)



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 12 JUL. 1996

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef de Division

Yves CAMPENON

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cédex 08
Téléphone : (1) 42 94 52 52
Télécopie : (1) 42 93 59 30

THIS PAGE BLANK (USP 10)

REQUETE

EN DÉLIVRANCE D'UN
TITRE DE PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE *

| | | |
|---|-------------------------------------|----------------------------------------------------|
| a | <input checked="" type="checkbox"/> | BREVET D'INVENTION |
| b | <input type="checkbox"/> | CERTIFICAT D'UTILITÉ |
| c | <input type="checkbox"/> | DEMANDE DIVISIONNAIRE |
| d | <input type="checkbox"/> | TRANSFORMATION D'UNE DEMANDE DE BREVET EUROPEEN |

Pour c et d, précisez : Nature, N° et date de la
demande initiale

2 OPTIONS OBLIGATOIRES au moment du dépôt (sauf pour le certificat d'utilité)

| | | | |
|-------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| LE DEMANDEUR REQUIERT L'ÉTABLISSEMENT DIFFÈRE OU RAPPORT DE RECHERCHE * | <input type="checkbox"/> OUI <input checked="" type="checkbox"/> NON | SI L'OPTION CHOISIE EST NON ET SI LE DEMANDEUR EST UNE PERSONNE PHYSIQUE, IL REQUIERT LE PAIEMENT ÉCHELONNÉ DE LA REDEVANCE DE RAPPORT DE RECHERCHE | <input type="checkbox"/> OUI <input checked="" type="checkbox"/> NON |
|-------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|

NATURE NUMÉRO DATE DE LA DEMANDE INITIALE

DATE DE REMISE DES PIÈCES

19 SEP. 1995

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

95 10977 -

DATE DE DÉPÔT

19 SEP. 1995

CODE POSTAL DU LIEU DE DÉPÔT

4 NUMÉRO DU POUVOIR PERMANENT

3 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À CUI TOUTE LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

L'OREAL
B. TEZIER HERMAN / D.P.I.
90, rue du Général Roguet
92583 CLICHY Cedex

5 RÉFÉRENCE DU CORRESPONDANT

OA 95185

6 TÉLÉPHONE DU CORRESPONDANT

47.56.86.81

7 TITRE DE L'INVENTION

UTILISATION D'AU MOINS UN PEPTIDE DANS UNE COMPOSITION COSMÉTIQUE OU POUR LA PRÉPARATION
D'UN MÉDICAMENT

8 DEMANDEUR(S) : Nom et Prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination et forme juridique

L'OREAL

N° SIREN

9 ADRESSE(S) COMPLÈTE(S)

14, rue Royale
75008 PARIS

PAYS

FRANCE

10 NATIONALITÉ(S)

Française

11 INVENTEUR(S)

LE DEMANDEUR EST L'UNIQUE
INVENTEUR *

☐ OUI

Si la réponse est non voir notice explicative

☒ NON

12

SI LE DEMANDEUR EST UNE PERSONNE
PHYSIQUE NON IMPOSABLE, IL
REQUIERT* OU A REQUIS LA RÉDUCTION
DES REDEVANCES*

☐ OUI

☒ NON

☒ DE DÉPÔT

REDEVANCES VERSÉES

☒ DE RAPPORT DE RECHERCHE

☐ DE REVENDICATION DE PRIORITÉ

☐ DE REVENDICATION (à partir de la 11e)

13 DÉCLARATION DE PRIORITÉ

OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE

LA DATE DE DÉPÔT D'UNE

DEMANDE ANTÉRIEURE

PAYS D'ORIGINE

DATE DE DÉPÔT

NUMÉRO

14

DIVISIONS

ANTÉRIEURES À LA
PRÉSENTE DEMANDE

N°

N°

N°

N°

15 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
NOM ET QUALITÉ DU SIGNAIRE-N° D'INSCRIPTION

B. TEZIER HERMAN

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

Divisi n Administrativ des Brevet

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

OA 95185

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

N° d'enregistrement national

9510977

Titre de l'invention :

UTILISATION D'AU MOINS UN PEPTIDE DANS UNE COMPOSITION COSMETIQUE OU POUR LA PREPARATION D'UN MEDICAMENT

Le (s) soussigné (s)

L'OREAL
14, rue Royale
75008 PARIS

désigne (nt) en tant qu'inventeur (s) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

MAHE Yann

36, avenue de l'Epargne
91390 MORSANG SUR ORGE

BUAN Bruno

101, rue Pierre et Marie Curie
93170 BAGNOLET

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

B. TEZIER

B. TEZIER HERMAN
19.09.1995

La présente invention concerne l'utilisation à titre de principe actif, dans un milieu physiologiquement acceptable, dans une composition cosmétique ou pour la préparation d'un médicament, d'une quantité efficace d'au moins un peptide contenant le tripeptide Lysine-Proline-Valine, ou de tout équivalent biologique fonctionnel, dans lequel le résidu Proline est sous la forme de son isomère optique dextrogyre, destinée à traiter l'inflammation.

L'inflammation est un ensemble de réactions biologiques qu'on retrouve dans toute l'échelle animale. Chez l'homme, deux malades sur trois présentent un syndrome inflammatoire. L'inflammation peut être localisée.

Elle peut se définir comme la première réponse à toute agression locale par une série de réactions non spécifiques déclenchées quelle que soit la cause initiale et se déroulant en trois temps : vasculaire, cellulo-vasculaire et fibrose tissulaire.

Gonflement, douleur, rougeur, chaleur sont les termes que l'on peut utiliser pour décrire l'inflammation localisée. Ceux-ci sont généralement dus à l'infiltration des tissus blessés par un oedème et/ou à la vasodilatation des capillaires.

Les signes de l'inflammation peuvent aller jusqu'à la fièvre, un état de malaise général et/ou une augmentation de la concentration de certaines protéines de plasma sanguin.

C'est un phénomène qui implique entre autres une série de réactions cellulaires locales et la libération de cytokines et autres médiateurs tels que la substance P, les prostaglandines, l'histamine ou encore la sérotonine.

Elle se manifeste par une modification du flot sanguin avec, au niveau du site agressé, une augmentation de la perméabilité vasculaire entraînant une fuite de protéines plasmatiques et de cellules vers le fluide extracellulaire, ainsi qu'une extravasation de leucocytes, principalement des leucocytes neutrophiles et de macrophages vers le site inflammatoire.

Ces phénomènes sont en fait le résultat de l'action des médiateurs de l'inflammation.

Parmi les facteurs impliqués dans ces phénomènes inflammatoires, on peut citer les cytokines dont en particulier l'interleukine 1- α , l'interleukine 1- β , l'interleukine 6, les facteurs de nécrose tumorale α et β (TNF- α et - β), les chémokines comme l'interleukine 8 ou le facteur chimiotactique et activateur des monocytes (MCAF), ou encore d'autres facteurs chimiotactiques responsables du recrutement des

cellules lymphocytaires, monocytaires, de Langerhans ou basophiles au niveau du site inflammatoire, tels que les leukotriènes B-4, ou encore d'autres facteurs impliqués dans la cascade inflammatoire, tels que l'acide arachidonique, ou les prostaglandines, dont en particulier les prostaglandines E2.

5

Les phénomènes inflammatoires sont associés à de nombreuses pathologies.

On peut citer à titre d'exemple l'érythème solaire, le prurit, l'érythème noueux, l'urticaire, la mastocytose systémique, le psoriasis, les piqûres d'insectes, d'autres affections dermatologiques comme la polychondrite atrophique,
10 l'érythémalgie, la nécrobiose lipoïdique. On peut encore citer le lupus érythémateux disséminé, les spondylarthropathies ou les atteintes articulaires des entéroopathies chroniques.

On recherche depuis de nombreuses années, dans l'industrie pharmaceutique,
15 des substances permettant de traiter l'inflammation.

A cet égard, il a été récemment proposé d'utiliser une quantité suffisante d'un dérivé de l'hormone stimulatrice des mélanocytes de type α (α -MSH) ou Mélanotropine et particulièrement le peptide contenant le tripeptide
20 Lysine-Proline-Valine (US 5028592, US 5157023).

Il a cependant été montré que la forme optique des isomères utilisés dans la composition du tripeptide avait une grande importance. Ainsi, il a été montré que lorsque le résidu Proline apparaît dans le tripeptide sous sa forme d'isomère optique dextrogyre (Dpro), le tripeptide ou le peptide contenant le tripeptide
25 perdait toute efficacité dans le traitement de l'inflammation (Hiltz et al. Peptides, vol. 12, pp 767-771, 1991).

Or, la demanderesse vient maintenant de découvrir, après d'importantes recherches menées sur la question, qu'un peptide contenant le tripeptide
30 Lysine-Proline-Valine, dans lequel le résidu Proline apparaît dans le tripeptide sous sa forme d'isomère optique dextrogyre (DPro), ou tout équivalent biologique fonctionnel est actif dans le traitement de l'inflammation.

Par équivalent biologique fonctionnel, on entend un peptide fonctionnellement équivalent en terme de fonction biologique dont l'un au moins des résidus
35 d'acide aminé peut avoir été changé pour un résidu d'acide aminé ayant un index hydropathique similaire.

Cette découverte est à la base de la présente invention.

Ainsi, l'invention concerne l'utilisation dans une composition cosmétique et/ou pour la préparation d'un médicament destinés à traiter l'inflammation d'au moins un peptide contenant le tripeptide Lysine-Proline-Valine, dans lequel le résidu Proline apparaît sous sa forme d'isomère optique dextrogyre (DPro), ou de tout équivalent biologique fonctionnel.

Dans le domaine des acides aminés, la géométrie des molécules est telle qu'elles peuvent théoriquement se présenter sous la forme d'isomères optiques différents. Il existe en effet une conformation moléculaire de l'acide aminé (aa) telle qu'elle dévie à droite le plan de polarisation de la lumière (conformation dextrogyre ou D-aa), et une conformation moléculaire de l'acide aminé (aa) telle qu'elle dévie à gauche le plan de polarisation de la lumière (conformation lévogyre ou L-aa).

La nature n'a retenu pour les acides aminés naturels que la conformation lévogyre. En conséquence un peptide d'origine naturelle ne sera constitué que d'acides aminés de type L-aa.

Cependant, la synthèse chimique en laboratoire permet de préparer des d'acides aminés ayant les deux conformations possibles. A partir de ce matériel de base il est possible d'incorporer lors de la synthèse de peptides aussi bien des d'acides aminés sous la forme d'isomères optiques dextrogyre ou lévogyre. On peut ainsi incorporer lors de la synthèse de peptides outre le résidu D-Proline (D-Pro), des résidus d'acides aminés Lysine ou Valine indifféremment sous leur forme D-Lysine (D-Lys), L-Lysine (L-Lys), D-Valine (D-Val) ou L-Valine (L-Val).

Ainsi, l'invention concerne plus particulièrement l'utilisation d'une quantité suffisante du peptide tel que défini précédemment, caractérisée par le fait que les résidus Lysine ou Valine du tripeptide Lysine-(D)Proline-Valine constituant le peptide sont indifféremment sous la forme d'isomères optiques dextrogyre ou lévogyre.

On peut citer ainsi les peptides contenant au moins l'un des tripeptides suivant :

- D-Lys-D-Pro-D-Val,
- D-Lys-D-Pro- L-Val,
- L-Lys-D-Pro-D-Val,
- L-Lys-D-Pro-L-Val.

Le tripeptide se trouve avantageusement à l'extrémité C-terminale du peptide.

Préférentiellement, le peptide utilisé selon l'invention est le tripeptide Lysine-Proline-Valine dans lequel le résidu Proline apparaît sous sa forme d'isomère optique dextrogyre (DPro).

De préférence également, le peptide utilisé selon l'invention contient le tripeptide Lysine-Proline-Valine dans lequel les résidu Lysine, Proline et Valine apparaissent sous la forme d'isomères optiques dextrogyres (DLys-DPro-DVal).

Selon l'invention, il peut bien entendu être utilisé plus d'un peptide. Dans ce cas, le mélange de peptides peut être constitué par l'une des combinaisons possibles des peptides ci-dessus décrits.

Dans le texte qui va suivre, de manière générale, le terme Proline s'entend comme désignant le résidu Proline sous sa forme d'isomère optique dextrogyre (DPro) et le terme "peptide" couvre aussi bien le "peptide contenant le tripeptide Lysine-Proline-Valine, ou tout équivalent biologique fonctionnel", que le "tripeptide Lysine-Proline-Valine" isolé, dans lesquels le résidu Proline est sous sa forme d'isomère optique dextrogyre (DPro).

Il se peut que pour des questions de résistance à la dégradation il soit nécessaire d'utiliser selon l'invention une forme protégée du peptide. La forme de la protection doit évidemment être une forme biologiquement compatible. De nombreuses formes de protections biologiquement compatibles peuvent être envisagées comme par exemple l'acylation ou l'acétylation de l'extrémité amino-terminale ou l'amidation de l'extrémité carboxy-terminale.

Ainsi, l'invention concerne une utilisation telle que précédemment définie, caractérisée par le fait que le peptide est sous une forme protégée ou non.

De préférence, on utilise selon l'invention une protection basée soit sur l'acylation ou l'acétylation de l'extrémité amino-terminale, soit sur l'amidation de l'extrémité carboxy-terminale soit encore sur les deux.

La quantité efficace d'actif correspond à la quantité nécessaire pour obtenir le résultat désiré.

Plus particulièrement, dans la composition cosmétique, le peptide est présent dans une quantité telle que le tripeptide Lysine-Proline-Valine est à une concentration comprise entre 10^{-12} M. et 10^{-3} M. et de préférence comprise entre 10^{-9} M. et 10^{-4} M..

Plus particulièrement, dans la préparation d'un médicament, le peptide est présent dans une quantité telle que le tripeptide Lysine-Proline-Valine peut être utilisé à une concentration comprise entre 10^{-12} M. et 1 M. et de préférence comprise entre 10^{-6} M. et 10^{-1} M..

Il est clair que l'homme du métier sait ajuster cette quantité de matériel selon qu'il utilise le peptide contenant le tripeptide Lysine-Proline-Valine, ou tout équivalent biologique fonctionnel ou le tripeptide Lysine-Proline-Valine.

La composition selon l'invention peut être administrée par voie parentérale, entérale ou encore par voie topique. De préférence, la composition est administrée par voie topique.

Le milieu physiologiquement acceptable dans lequel le peptide est utilisé selon l'invention peut être anhydre ou aqueux. On entend par milieu anhydre, un milieu solvant contenant moins de 1% d'eau. Ce milieu peut être constitué d'un solvant ou d'un mélange de solvants choisi plus particulièrement parmi les alcools inférieurs en C₂-C₄ comme l'alcool éthylique, les alkylèneglycols comme le propylèneglycol, et les alkyléthers d'alkylèneglycols ou de dialkylèneglycols, dont les radicaux alkyle ou alkylène contiennent de 1 à 4 atomes de carbone. On entend par milieu aqueux, un milieu constitué par de l'eau ou un mélange d'eau et d'un autre solvant physiologiquement acceptable, choisi notamment parmi les solvants organiques cités ci-dessus. Dans ce dernier cas, ces autres solvants, lorsqu'ils sont présents, représentent environ 5 à 95% en poids de la composition.

Il est possible que le milieu physiologiquement acceptable puisse contenir d'autres adjuvants habituellement utilisés dans le domaine cosmétique ou pharmaceutique, tels que des agents tensioactifs, des agents épaississants ou gélifiants, des agents cosmétiques, des agents conservateurs, des agents alcalinisants ou acidifiants bien connus dans l'état de la technique, et en quantités suffisantes pour obtenir la forme de présentation désirée, notamment

de lotion plus ou moins épaissie, de gel, d'émulsion, ou de crème. L'utilisation peut éventuellement se faire sous une forme pressurisée en aérosol ou vaporisée à partir d'un flacon pompe.

- 5 Il est possible aussi d'utiliser en association avec le peptide, des composés déjà décrits pour leur activité anti-inflammatoire.

On peut plus particulièrement citer les glucocorticoïdes, la vitamine D et ses dérivés et les anti-inflammatoires non stéroïdiens.

10

L'utilisation du peptide selon l'invention peut se faire par application topique d'une composition cosmétique contenant une quantité efficace d'au moins un peptide contenant le tripeptide Lysine-Proline-Valine dans lequel le résidu Proline apparaît sous sa forme d'isomère optique dextrogyre (DPro), sur une

15

Ainsi, la présente invention a également pour objet un procédé de traitement cosmétique, caractérisé en ce que l'on applique sur la peau, sur le cuir chevelu et/ou sur les muqueuses des zones cutanées présentant les symptômes de

20

l'inflammation.
Le procédé de traitement cosmétique de l'invention peut être mis en oeuvre notamment en appliquant les compositions cosmétiques telles que définies ci-dessus selon la technique d'utilisation habituelle de ces compositions. Par exemple : application de crèmes, de gels, de sérums, de lotions, de laits de

25

démaquillage ou de compositions anti-solaires sur la peau ou sur le cuir chevelu, de shampooings, ou encore application de dentifrice sur les gencives.
On va maintenant donner à titre d'illustration des exemples qui ne sauraient limiter en aucune façon la portée de l'invention. Dans les compositions les

30

Exemple 1: Activité dose-réponse du tripeptide Ac - LPV - NH₂* sur la production d'interleukine 1 α dans le surnageant de cheveux épilés provenant d'un alopécique inflammatoire :

35

Des cheveux épilés sont prélevés dans la zone du vertex sur un alopécique inflammatoire volontaire. Ils sont placés dans un milieu de survie William's E

(vendu par la société Gibco BRL) contenant de la pénicilline G (100 unités /ml), de la streptomycine-S (100µg/ml), de l'Amphotericine (250 ng/ml), en présence ou non (contrôle), du tripeptide Ac - LPV - NH₂* synthétisé à façon par la société Neosystem S.A. (Strasbourg) aux doses indiquées. Après 20 heures d'incubation, les surnageants de culture sont collectés dans un tube puis centrifugés 5 minutes à 14000 tours/minute (centrifugeuse Eppendorff, modèle 5415C). Les surnageants sont alors collectés dans un tube propre et placés à 4°C.

La concentration en interleukine 1-α est ensuite évaluée sur 100µl de surnageant au moyen d'un kit ELISA Biotrak commercialisé par la société Amersham, suivant les instructions du fournisseur.

Résultats:

| | Dose | IL-1α | %d'inhibition |
|----|------------------------------|-----------|---------------|
| 15 | Contrôle | 21.8pg/ml | |
| | Ac - LPV - NH ₂ * | 10µM | 72% |
| | Ac - LPV - NH ₂ * | 1µM | 49% |

Exemple 2 :

20 Inhibition de l'expression des ARN messagers de cytokines pro-inflammatoires et inflammatoires en réponse au tripeptide Ac - LPV - NH₂*.

Dix cheveux épilés sont prélevés dans la zone du vertex sur un alopécique inflammatoire volontaire. Ils sont placés dans un milieu de survie William's E (vendu par la société Gibco BRL) contenant de la pénicilline G (100 unités /ml), de la streptomycine-S (100µg/ml), de l'Amphotericine (250 ng/ml), en présence (lot traité) ou non (lot contrôle) du tripeptide Ac - LPV - NH₂* synthétisé à façon par la société Neosystem S.A., Strasbourg .

Après 3h30 d'incubation, les ARN messagers correspondant à ces deux lots de cheveux sont purifiés à partir d'un kit « quick prep mRNA purification Kit » commercialisé par la société Pharmacia. Des ADN complémentaires de ces ARNm sont ensuite préparés au moyen d'un kit de reverse transcription commercialisé par la société Pharmacia en suivant les instructions du fournisseur puis soumis à une étape de réaction de polymérisation en chaîne (PCR) en utilisant des amorces spécifiques des ARNm de la Glyceraldéhyde 3-Phosphate Désydrogénase (GAPDH), de l'IL-1 alpha, du récepteur à l'IL-1 de type 1 et du récepteur à l'IL-1 de type 2. Les quantités d'ADN amplifié sont ensuite évaluées par électrophorèse sur gel d'agarose à 1.5% en présence de

bromure d'éthidium. L'intensité des bandes est estimée sous irradiation ultraviolette au moyen d'une caméra vidéo et d'un logiciel d'analyse (Bioprofil TM) commercialisés par la société Vilbert-Lourmat. L'intensité des bandes obtenues avec les amorces IL-1 α , IL-1R1, IL-1R2 est divisée par l'intensité des bandes obtenue avec les amorces amplifiant le standard interne GAPDH.

Résultats:

| % d'expression | IL-1 α | IL-1R1 | IL-1R2 |
|----------------|---------------|--------|--------|
| Lot contrôle | 100% | 100% | 100% |
| Lot traité | 0% | 26% | 21% |

Exemple 3 :

Effet inhibiteur du Ac - LPV - NH₂* sur l'expression des ARNm de l'IL-1 α calcul du ratio IL-1 α /GAPDH:

Sur deux donneurs différents, 5 cheveux sont épilés puis incubés 20 heures à 37°C (5% CO₂) dans du milieu E de William supplémenté en antibiotiques, en glutamine et en présence d' Ac - LPV - NH₂* aux concentrations indiquées. Un contrôle est réalisé dans lequel il n'y a pas de peptide ajouté. Les résultats sont exprimés en % du contrôle.

| Donneurs | | A | B |
|------------------------------|-------------|------|-------|
| Contrôle | | 100% | 100% |
| Ac - LPV - NH ₂ * | 10 μ M | 28% | 28.7% |
| Ac - LPV - NH ₂ * | 1 μ M | 51% | 62% |
| Ac - LPV - NH ₂ * | 0.1 μ M | ND | 53% |
| ND : Non déterminé | | | |

Exemple 4 :

Mesure de l'inhibition de la production de PGE₂ par des cellules de papille catagène en culture in vitro :

Les cellules (1000 par puits), au passage 24, sont incubées dans du milieu 199 commercialisé par la société GIBCO en présence de 1% de sérum de veau foetal et d'antibiotiques. 20 heures après, le milieu est remplacé par un milieu identique mais contenant les tripeptides à évaluer à la concentration finale de

10µM. 5 heures plus tard, l'interleukine 1α est ajoutée à la concentration finale de 10 ng/ml. 20 heures après, les taux de PGE2 produits par les cellules de papille en culture sont évalués au moyen d'un kit Biotrak commercialisé par la société Amersham en suivant les instructions du fournisseur. Cette méthode permet ainsi d'évaluer l'effet inhibiteur de ces tripeptides sur la production de PGE2 induites par une cytokine pro-inflammatoire: l'interleukine 1α.

| | Dose | PGE2 (pg/ml) | |
|---------------------------------|------|--------------|--------------|
| Contrôle | | 9.2 | |
| IL-1α | | 100.2 | |
| | | | % inhibition |
| Ac - LPV - NH ₂ * | 10µM | 22.0 | 78% |
| Ac-L-P-V-NH ₂ ** | 10µM | 10.0 | 90% |
| Ac-L-(D)P-V-NH ₂ *** | 10µM | 24.6 | 75% |

Ces résultats indiquent, de façon surprenante, une capacité anti-inflammatoire comparable des tripeptides contenant soit la forme (D)-Pro soit la forme naturelle (L)Pro.

Exemple 5 : Exemples de compositions contenant le tripeptides Ac - LPV - NH₂*. Ces compositions sont obtenues par les techniques de préparations classiques et en particulier par simple mélange des ingrédients.

Composition 1 : Spray :

| | | |
|------------------------------|--------------------|-------|
| Ac - LPV - NH ₂ * | 5.10 ⁻⁶ | g |
| Minoxidil | 0,5 | g |
| Ethanol à 95° | 55,1 | g |
| Propylène glycol | 22,8 | g |
| Parfum | qs | |
| Eau déminéralisée | qsp | 100 g |

Composition 2 : Lotion quotidienne :

| | | |
|-------------------------------|-----------------------|-------|
| Ac - LPV - NH ₂ * | 12,5 10 ⁻⁶ | g |
| 2,4 diaminopyrimidine-3-oxyde | 0,75 | g |
| Ethanol à 95° | 30 | g |
| Parfum | qs | |
| Colorants | qs | |
| Eau déminéralisée | qsp | 100 g |

Composition 3 : Gel liposomé :

| | | | |
|----|--------------------------------------------------------------------|--------------------|--------|
| | Natipide II [®] (soit 2 g en phospholipides) | 10 | g |
| 5 | Ac - LPV - NH ₂ * | 5.10 ⁻⁵ | g |
| | Carbomer | 0,25 | g |
| | Triéthanolamine | qs | pH = 7 |
| | Conservateurs | qs | |
| 10 | Eau déminéralisée | qsp 100 | g |
| | [®] Mélange Eau/Alcool/Lécithine de la Société Nattermann | | |

Composition 4 : Gel niosomé :

| | | | |
|----|-------------------------------------------------------------------|----------------------|--------|
| 15 | Chimexane NS [®] | 1,8 | g |
| | Stearoylglutamate monosodique | 0,2 | g |
| | Ac - LPV - NH ₂ * | 7,5 10 ⁻⁴ | g |
| | Carbomer | 0,2 | g |
| 20 | Triéthanolamine | qs | pH = 7 |
| | Conservateurs | qs | |
| | Parfums | qs | |
| | Eau déminéralisée | qsp 100 | g |
| 25 | [®] Tensioactif non ionique vendu par la société Chimex. | | |

Composition 5 : Lotion niosomée :

| | | | |
|----|-------------------------------|------------------|---|
| | Chimexane NL [®] | 0,475 | g |
| 30 | Cholestérol | 0,475 | g |
| | Stearoylglutamate monosodique | 0,05 | g |
| | Ac-LPV-NH ₂ * | 10 ⁻³ | g |
| | Conservateurs | qs | |
| | Colorants | qs | |
| 35 | Parfum | qs | |
| | Eau déminéralisée | qsp 100 | g |

[®] Tensioactif non ionique vendu par la société Chimex.

Composition 6 : Crème de soin : émulsion H/E

| | | | |
|----|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|---|
| 5 | Alcool cétylstéarylique/Alcool cétylstéarylique oxyéthylénée à 33 moles d'oxyéthylène (80/20) | 5 | g |
| | Monostéarate de glycérol | 1,5 | g |
| | Alcool cétylique | 0,75 | g |
| | Huile de vaseline | 10 | g |
| | Polydimethylsiloxane | 0,75 | g |
| 10 | Glycérine | 4 | g |
| | Conservateurs | qs | |
| | Ac-LPV-NH ₂ * | $5 \cdot 10^{-3}$ | g |
| | Eau déminéralisée | qsp 100 | g |

15 Composition 7 : Solution injectable par voie intradermique

| | | | |
|--|---------------------------------------------------------------|----------|----|
| | Ac-LPV-NH ₂ * | 0,7 | mg |
| | Sérum physiologique (NaCl 9 g/H ₂ O qsp 100 ml) | q.s.p. 1 | ml |

20

* : Acétyl - (D)Lys - (D)Pro - (D)Val - NH₂** : Acétyl - (L)Lys - (L)Pro - (L)Val - NH₂*** : Acétyl - (L)Lys - (D)Pro - (L)Val - NH₂

25

REVENDECATIONS

- 1- Utilisation dans une composition cosmétique ou pour la préparation d'un médicament, d'une quantité efficace d'au moins un peptide contenant le tripeptide Lysine-Proline-Valine dans lequel le résidu Proline apparaît sous sa
5 forme d'isomère optique dextrogyre (DPro) ou de tout équivalent biologique fonctionnel, destinée à traiter l'inflammation
2. Utilisation selon la revendication précédente, caractérisée par le fait que le tripeptide se trouve à l'extrémité C-terminale du peptide.
10
3. Utilisation selon l'une des revendications précédentes, caractérisée par le fait que le peptide est le tripeptide Lysine-Proline-Valine dans lequel le résidu Proline apparaît sous sa forme d'isomère optique dextrogyre (DPro).
4. Utilisation selon l'une des revendications précédentes, caractérisée par le fait
15 que le peptide est le tripeptide Lysine-Proline-Valine dans lequel les résidus Lysine, Proline et Valine apparaissent sous la forme d'isomères optiques dextrogyres (D-Lys-D-Pro-D-Val).
5. Utilisation selon l'une des revendications précédentes, caractérisée par le fait
20 que le peptide est sous une forme protégée ou non.
6. Utilisation selon la revendication précédente, caractérisée par le fait que la protection consiste en une protection basée soit sur l'acylation ou l'acétylation
25 de l'extrémité amino-terminale, soit sur l'amidation de l'extrémité carboxy-terminale soit encore sur les deux..
7. Utilisation dans une composition cosmétique selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée par le fait que le tripeptide
30 Lysine-Proline-Valine présent dans lequel le résidu Proline apparaît sous sa forme d'isomère optique dextrogyre (DPro) est utilisé à une concentration comprise entre 10^{-12} M. et 10^{-3} M. et de préférence comprise entre 10^{-9} M. et 10^{-4} M.
8. Utilisation pour la préparation d'un médicament selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée par le fait que le tripeptide Lysine-Proline-Valine dans lequel le résidu Proline apparaît sous sa forme d'isomère optique
35

dextrogyre (DPro) est utilisé à une concentration comprise entre 10^{-12} M. et 1 M. et de préférence comprise entre 10^{-6} M. et 10^{-1} M.

- 5 9. Procédé de traitement cosmétique, caractérisé en ce que l'on applique sur la peau, sur le cuir chevelu et/ou sur les muqueuses présentant les symptômes de l'inflammation une composition cosmétique contenant une quantité efficace d'au moins un peptide contenant le tripeptide Lysine-Proline-Valine dans lequel le résidu Proline apparaît sous sa forme d'isomère optique dextrogyre (DPro).

THIS PAGE BLANK (USPTO)